



Universidad
Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

*Identificación y caracterización de las variantes alélicas intrónicas
C.4560+4A>G en el gen NIPBL y C.548-4_3dupTT en el gen SMC3
en dos pacientes con SCdL.*

*Identification and characterization of the intronic allelic variants
c.4560+4A>G in NIPBL gene and c.548-4_3dupTT in SMC3 gene in
two patients with CdLS.*

Autor:

Daniel Salvo Chabuel

Director/a:

Beatriz Puisac Uriol

**Departamento de Farmacología y Fisiología
Facultad de Medicina 2016**

Índice

1. Resumen.....	1
1.1. Resumen.....	1
1.2. Abstract	2
2. Introducción	3
2.1. El Síndrome Cornelia de Lange.....	3
2.2. Clínica	3
2.3. Bases Moleculares.....	4
2.4. Splicing	6
2.5. Splicing y mutaciones	7
2.6. Splicing en NIPBL	8
3. Justificación y Objetivos	9
4. Material y Métodos	10
4.1. Historia clínica de los pacientes	10
4.2. Escalas de valoración de gravedad.....	10
4.3. Métodos	11
4.3.1. Identificación de la mutación en el DNA.....	11
4.3.2. Análisis bioinformático del efecto de las mutaciones.....	15
4.3.3. Estudio del mRNA.....	15
5. Resultados	19
5.1. Historia clínica de los pacientes	19
5.1.1. Paciente 1.....	19
5.1.2. Paciente 2	21
5.2. Aplicación de la clasificación de Gilis	22
5.3. PCR y electroforesis en gel de agarosa	22
5.4. Mutaciones en el DNA genómico	23
5.5. Resultados del análisis bioinformático.....	24
5.6. Identificación de transcritos aberrantes en gel de agarosa	24
5.7. Secuenciación del cDNA	25
6. Discusión	26
7. Conclusiones.....	28
8. Bibliografía	29
Anexos	31

1. Resumen

1.1 Resumen

El Síndrome Cornelia de Lange (SCdL) es un trastorno congénito que se caracteriza por malformaciones, alteraciones del desarrollo y afectación de múltiples sistemas. Se trata de una entidad con importante heterogeneidad tanto clínica como genética. En la actualidad se conocen 5 genes causales relacionados con el síndrome: *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* y *HDAC8*. Estos genes están involucrados en la estructura y regulación del anillo de cohesinas. La principal causa de la enfermedad, responsable del 80% de los casos, son las mutaciones en *NIPBL*, siendo casi todos los casos esporádicos por mutaciones *de novo*. Se estima que un 17% de los casos de mutaciones en *NIPBL* se deben a mutaciones que afectan al proceso de *splicing*.

En este trabajo se estudian dos casos en los que se ha procedido a hacer diagnóstico genético del SCdL debido a la clínica que presentan. En ambos se evidencian variantes alélicas en regiones intrónicas reguladoras del proceso de *splicing*.

El paciente 1 presenta la mutación c.4560+4A>G en el intrón 21 de *NIPBL*. Mediante estudio del mRNA se ha determinado que genera un transcrito con la pérdida del exón 21 y ruptura del marco de lectura, generando un codón de stop 66 aminoácidos más adelante. A pesar de que el transcrito aberrante altera el marco de lectura y podría afectar a la estructura de *NIPBL*, el paciente se ha clasificado como un fenotipo leve de SCdL.

En el paciente 2 se detectó la mutación c.548-4_-3dupTT en el intrón 8 de *SMC3*. En el estudio de mRNA se ha determinado que no parece afectar al normal funcionamiento del *splicing* de *SMC3*. Posteriormente se ha detectado esa misma mutación en el padre del paciente 2. A pesar de estos hallazgos, el fenotipo del paciente es sugestivo de SCdL de grado leve. En la actualidad, se continúa el estudio genético para determinar la causa responsable del síndrome en este paciente.

PALABRAS CLAVE: Síndrome Cornelia de Lange, *splicing*, *NIPBL*, *SMC3*

1.2 Abstract

Cornelia de Lange syndrome (CdLS) is a congenital disorder that is characterized by malformations, development alterations and affects multiple systems. It is an entity with important clinical and genetic heterogeneity. Currently, there are 5 causal genes linked to the syndrome: *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* and *HDAC8*. These genes are involved in the structure and regulation of the cohesin ring. The main cause of the disorder, responsible for 80% of the cases, are mutations of *NIPBL*, most of which are caused by *de novo* mutations. It is estimated that 17% of the mutations of *NIPBL* are due to variations that affect the splicing process.

This work studies two cases in which genetic diagnosis has been applied due to their clinical manifestations. In both cases there's evidence of allelic variants in intronic regions that regulate the splicing process.

Patient 1 carries the mutation c.4560+4A>G in intron 21 of *NIPBL*. Through mRNA studies it has been determined that it generates a transcript with a loss of exon 21 and a shift in the reading frame, generating a stop codon 66 aminoacids upstream. Although the aberrant transcript alters the reading frame, the patient has been classified as a mild CdLS phenotype.

Patient 2 carries the mutation c.548-4_-3dupTT in intron 8 of *SMC3*. Through mRNA studies it has been determined that it appears to have no effect in the normal splicing of *SMC3*. Afterwards, this same mutation has been detected in the patient's father. In spite of these findings, the patient's phenotype is suggestive of a mild CdLS. Currently there's an ongoing study to determine the cause of the syndrome in this patient.

KEY WORDS: Cornelia de Lange Syndrome, splicing, *NIPBL*, *SMC3*

2. Introducción

2.1 El Síndrome Cornelia de Lange

El síndrome de Cornelia de Lange (SCdL) es una patología congénita malformativa del desarrollo de afectación multisistémica, con heterogeneidad clínica y genética. Se caracteriza por presentar rasgos faciales representativos, malformaciones de las extremidades, discapacidad intelectual, retraso psicomotor, retraso del crecimiento pre y postnatal hirsutismo y reflujo gastroesofágico, entre otros signos y síntomas. Fue tipificado como un síndrome por primera vez en 1933 por la Dra. Cornelia de Lange, habiéndose ya descrito casos del fenotipo característico previamente en 1849 por Gerardus y Willem Vrolik; y en 1916 por el Dr. Brachmann.¹

La definición de la incidencia de este síndrome es una tarea difícil, ya que al ser una patología con un espectro clínico tan amplio, existen casos infradiagnosticados. Se estima que 1:10.000-30.000 nacidos vivos está afectado.²

La mayoría de los casos de SdCL son mutaciones *de novo*, si bien existen casos familiares. Su herencia es autosómica dominante o ligada al X dominante, dependiendo de qué gen es el causante de la enfermedad.¹

2.2 Clínica

Los pacientes con SCdL presentan un aspecto cráneo-facial característico que incluye: microbraquicefalia, cejas finas, juntas (sinofridia) y arqueadas; pestañas alargadas, orejas de implantación baja y posteriormente rotadas, puente nasal deprimido, narinas antevertidas, *philtrum* alargado, labio superior fino, comisuras bucales orientadas hacia abajo, dientes pequeños y espaciados y micrognatia.^{1,3,4}



Figura 1: Rasgos faciales característicos del SCdL.⁵

Son características también las malformaciones distales de las extremidades, siendo predominantes en extremidad superior. La afectación es de gravedad variable, con casos descritos de manos de pequeño tamaño, acortamiento del primer metacarpo, sindactilia, braquiclinodactilia y pliegue palmar transversal unilateral. Un tercio de los pacientes presentan malformaciones graves de las extremidades superiores: ausencia del antebrazo con

implantación de los dedos en el codo, oligodactilia. En la extremidad inferior predominan los pies de pequeño tamaño y la sindactilia parcial del segundo y tercer dedo.^{1,3,4}

El retraso psicomotor y la discapacidad intelectual son otro aspecto de este síndrome que aparece de forma variable, desde un CI *borderline* a una deficiencia profunda. Generalmente el lenguaje es una de las funciones que se afectan con mayor gravedad, siendo la memoria visual una de las más respetadas. Estos pacientes también tienen alteraciones de la conducta, dando lugar a comportamientos agresivos, episodios autolesivos, déficit de atención, timidez o depresión.^{3,4}

Estos pacientes presentan habitualmente retraso del crecimiento pre y postnatal. Es frecuente que al nacimiento se encuentren por debajo del percentil 3 en longitud, peso y circunferencia cefálica. Postnatalmente, tienen una velocidad de crecimiento baja, siendo necesarias tablas específicas para valorarlo. Es incierto en que magnitud este problema es secundario a otras afecciones, como las alteraciones digestivas, y en cuanto es atribuible a causas primarias.^{3,4}

En cuanto al efecto del síndrome en otros sistemas, son frecuentes las alteraciones digestivas, en concreto se sabe que la incidencia de reflujo gastroesofágico en estos pacientes es muy alta y afecta a su calidad de vida. También tienen una incidencia elevada de hirsutismo, epilepsia, malformaciones genitourinarias, cardiopatías y alteraciones de la audición.^{3,4}

La amplia variabilidad del fenotipo del SCdL hace que para su diagnóstico sea necesario valorar múltiples sistemas afectados, al igual que su grado de afectación. Para ello se utilizan los criterios diagnósticos elaborados por la Dra. Antonie D. Kline, que dividen las manifestaciones del síndrome entre criterios principales y secundarios, y establecen un mínimo de criterios para el diagnóstico. Adicionalmente, permite categorizar al síndrome según su gravedad: leve (<15 puntos), intermedio (15-22 puntos) o grave (>22 puntos).^{4,6} Similarmente, también se puede utilizar la clasificación de Gillis, que valora la gravedad de 3 parámetros: defectos en extremidades, desarrollo y habilidades cognitivas, y crecimiento. Establece una serie de criterios que permite clasificar la afectación de éstos en clase I (Leve), clase II (Moderado) o clase III (Severo).^{4,7}

2.3. Bases Moleculares

Se han descrito 5 genes implicados en la enfermedad: *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* y *HDAC8*, todos ellos forman o están involucrados en la regulación del anillo de cohesinas.^{2,8}

El anillo de cohesinas es una estructura proteica formada por 4 componentes: Smc1, Smc3, Rad21/Rec8 y SA1/SA2/STAG3. Inicialmente sólo se le atribuía la función de la cohesión de las cromátidas hermanas en la división celular. Sin embargo posteriormente se ha descubierto que está involucrado en otros procesos como la reparación del DNA, la expresión génica y la condensación de cromosomas.^{9,10,11}

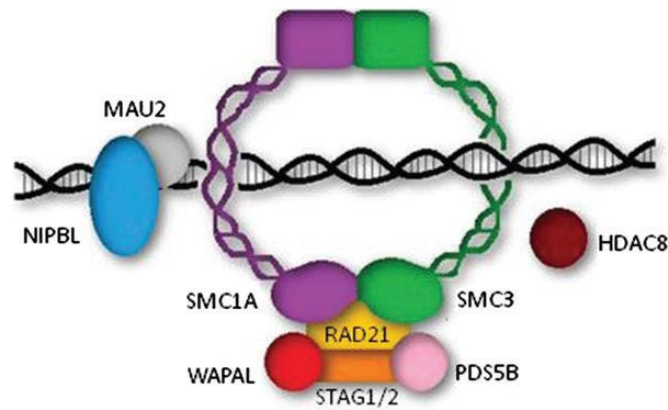


Figura 2: Estructura del anillo de cohesinas. Los componentes estructurales SMC1, SMC3, RAD21 y STAG forman el anillo. También están involucrados factores reguladores como NIPBL, que permite cargar el anillo a la cromatina, o HDAC8, una histona deacetilasa de SMC3.¹²

La mutación de algunos de sus componentes estructurales o reguladores puede llevar a una pérdida de funcionalidad. Su función en la regulación de la transcripción es más sensible a la pérdida de funcionalidad que la de cohesión. Precisamente, se cree que la disregulación en la transcripción es la causante del SCdL.¹² Los trastornos producidos por esto son las llamadas cohesinopatías.^{9,13} Se han descrito cohesinopatías diferentes al SCdL. El síndrome de Roberts-SC focomelia por ejemplo, produce un fenotipo extremadamente similar al del SCdL. Se produce debido a mutaciones en *ESCO2*, el cual está involucrado en procesos de transcripción y cohesión de cromátides hermanas, y es uno de los factores reguladores de SMC3.^{8,12,13}

NIPBL se sitúa en el cromosoma 5p13.2. Es responsable del 80% de los casos del SCdL. Codifica un factor regulador del anillo de cohesinas, cuya función es cargar el anillo a la cromatina. Este gen es el responsable del fenotipo clásico: facies característica, alteraciones en extremidades superiores, retraso del crecimiento, déficit intelectual y retraso psicomotor.^{1,2} El grado de afectación de los pacientes con mutación en el gen *NIPBL* es irregular, y depende del tipo de mutación y de la región del gen afectada. Independientemente, sujetos con una misma mutación pueden diferir en el fenotipo, dejando en evidencia un posible efecto ambiental sobre el síndrome

SMC1A y *SMC3* se encuentran en el cromosoma Xp11.22-pl 1.21 y 10q25,2 respectivamente. *SMC1A* encuentra mutado en aproximadamente un 5% de los casos del SCdL, mientras que se estima que *SMC3* suponga aproximadamente un 1%. Codifican dos de las subunidades del anillo de cohesinas.¹⁴ Se corresponden con fenotipos leves del SCdL. Cabe destacar que en los pacientes afectados por una mutación de *SMC3*, predomina la discapacidad intelectual. Por el contrario, las malformaciones mayores en las extremidades y las alteraciones del comportamiento son raras, y se ha destacado que son amistosos.^{1,2,15}

HDAC8 se encuentra en el cromosoma Xq13.1. Se encuentra mutado en aproximadamente un 4% de los casos del SCdL. Codifica una histona deacetilasa que deacetila SMC3 en la fase S. Su mutación da un fenotipo similar al clásico de Cornelia, pero sin afectación de extremidades.^{1,2,16}

RAD21 se encuentra en el cromosoma 8q24.11. Se han descrito 8 mutaciones de este gen. Codifica una de las subunidades del anillo de cohesinas, Rad21, cuya función es principalmente

estructural, manteniendo el anillo cerrado. Su mutación da un fenotipo similar al clásico, con una menor afectación de las capacidades cognitivas.^{1,2,17}

2.4. Splicing

El término inglés de *splicing* se refiere al proceso de "corte y empalme" mediante el cual se eliminan los intrones (regiones no codificantes) de un mRNA precursor y se ensamblan las regiones codificantes, o exones. De este modo, esta hebra de mRNA codificante podrá ser traducida en una proteína. Existen múltiples tipos de *splicing*, pero el que más nos interesa al estudiar la genética humana es el mediado por el espliceosoma.

El espliceosoma es un complejo formado por 5 ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs) que actúa como catalizador en la reacción de *splicing*. Como sus subunidades tienen un componente de ribonucleótido, son capaces de interactuar con el mRNA. Existen 2 tipos de espliceosoma, un espliceosoma mayor, compuesto por las subunidades U1, U2, U4, U5 y U6, responsable del 99% de las reacciones de *splicing*; y uno menor, con 5 subunidades análogas, que actúa en situaciones más excepcionales.¹⁸

Las snRNPs y una serie de factores asociados reconocen regiones concretas de los intrones a la hora de iniciar el *splicing*:

- Secuencia consenso GU en el sitio donante (extremo 5')
- Secuencia consenso AG en el sitio aceptor (extremo 3')
- Secuencia de ramificación (contiene una adenina central)
- Tracto de polipirimidinas (región rica en pirimidinas), localizada entre el sitio A y el extremo 3'.^{18,19}

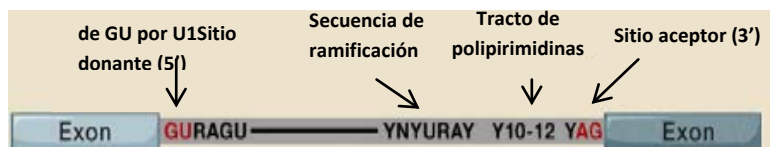


Figura 3: Secuencias fundamentales involucradas en el proceso del *splicing*.¹⁹

A grandes rasgos, el *splicing* mediado por espliceosoma ocurre en 4 fases:

Primero ocurren una serie de reconocimientos en regiones intrónicas. U1 reconoce la secuencia GU en 5', BBP reconoce el punto A y los factores auxiliares de U2 reconocen la región rica en pirimidinas y la secuencia AG en 3'.

Posteriormente U2 ocupa el lugar del BBP, seguido del resto de subunidades del espliceosoma.

El primer exón en separarse es el que se encuentra en el sitio donante. Esto ocurre mediante una transesterificación que reemplaza el extremo 3' del exón por el sitio de ramificación, formando una estructura en forma de lazo llamada lariat.

Finalmente, mediante una nueva transesterificación, el exón previamente escindido ocupa el lugar del extremo 3' del intrón.¹⁹

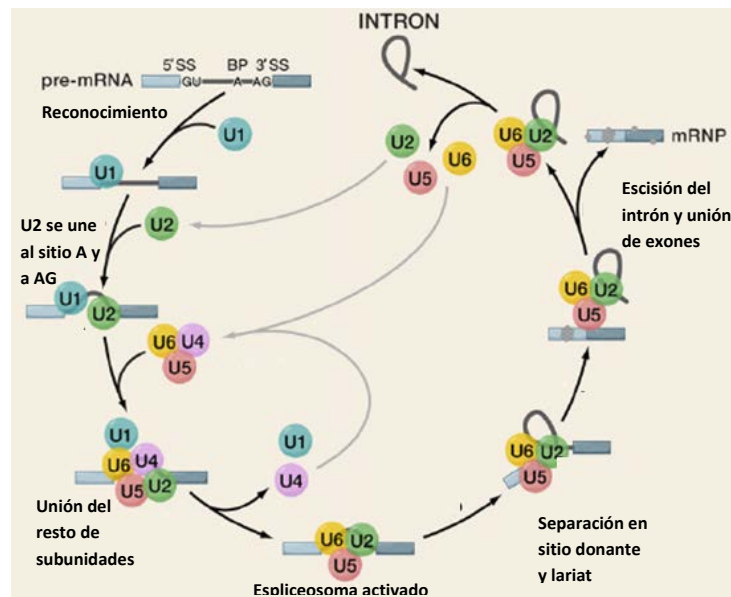


Figura 4: Esquema del ciclo del *splicing* mediado por espliceosoma.¹⁹

En el proceso de *splicing*, no todos los exones son un componente indispensable para el resultado final. Durante el *splicing* de un mRNA precursor, la omisión o no de ciertos exones dará lugar a diferentes isoformas de la proteína. A esto se le llama *splicing* alternativo.^{19,20}

2.5. Splicing y mutaciones

Las mutaciones que interfieren con el proceso normal del *splicing* alteran la información genética del mRNA pudiendo, con frecuencia, repercutir en la traducción en proteína anómala estructural y funcionalmente.²¹

Una mutación en los sitios de *splicing* en la mayoría de las ocasiones supone la omisión del exón contiguo. Aunque también hay casos en los que provoca la pérdida parcial del exón debido a sitios de *splicing* crípticos o es capaz de anular los sitios de *splicing* originales y crear nuevos.^{22,23} Como consecuencia, cabe la posibilidad de que se rompa el marco de lectura y se genere una proteína aberrante en la que se altere la secuencia de aminoácidos e incluso aparezca un codón de stop prematuro. Dependiendo del material genético que se pierda debido al *splicing* anómalo, y de en qué regiones de la proteína final se traduzca dicha información, las funciones de la proteína pueden verse afectadas e incluso estar ausentes.^{23,24}

Estas mutaciones pueden afectar a elementos en *cis* dentro de un sólo gen, o en *trans* alterando los mecanismos del *splicing* normal y de su regulación. De tal modo una mutación en *cis* tendrá efecto en la expresión de un único gen, mientras que una en *trans* puede llegar a afectar a la de varios genes. En cuanto a las mutaciones intrónicas que alteran el *splicing*, son de especial relevancia las mutaciones en *cis* en regiones específicas del intrón.²¹

Las secuencias consenso (donante y aceptora) son vitales para que el espliceosoma se sitúe correctamente por esta razón la alteración en las secuencias GU donante y AG aceptora dificultan que el espliceosoma reconozca el punto de separación, y por ello es frecuente que se pierda parte o la totalidad del exón contiguo. En cuanto a la región de ramificación y al tracto de polipirimidinas, son regiones amplias en las que las mutaciones han sido menos estudiadas.

Otra mutación que podría producir un *splicing* aberrante es sustitución de la adenina central de la región de ramificación, que impide la formación del lariat y la consecuente escisión del intrón.²²

2.6. Splicing en *NIPBL*

El gen *NIPBL* se compone de 47 exones, y puede originar diferentes isoformas dependiendo del modo en el que suceda el *splicing*. Inicialmente se describieron 2 en tejido embrionario. La isoforma principal se denomina A, una proteína de 2804 aminoácidos codificada por los exones 2-47. Una forma alternativa, llamada B, es una proteína de 2697 aminoácidos codificada por los exones 2-46. Ambas isoformas son idénticas desde el primer aminoácido hasta el 2683.²⁴ Posteriormente, se han descrito 4 nuevas isoformas fisiológicas en estudio de leucocitos de humano adulto, que se originan por la exclusión de determinados exones. Éstas son: $\Delta E10$, $\Delta E12$, $\Delta E33,34$ y B'($\Delta E45$).²⁴

Se estima que el 17% de los casos de SCdL se deben a mutaciones que alteran el mecanismo de *splicing* normal. Una mutación en los sitios de *splicing* en la mayoría de las ocasiones supone la omisión del exón contiguo. Aunque también hay casos en los que provoca la pérdida parcial del exón debido a sitios de *splicing* crípticos o es capaz de anular los sitios de *splicing* originales y crear nuevos.^{23,24}

En el caso del gen *NIPBL* se han descrito tanto mutaciones en los sitios donante y aceptor como otras regiones intrónicas: el sitio de ramificación A o el tracto de polipirimidinas. A diferencia de otros tipos de mutaciones que tienden a acumularse en determinadas regiones de *NIPBL*, éstas parecen distribuirse al azar en el gen.²⁴

3. Justificación y Objetivos

El objetivo general de este trabajo ha sido caracterizar dos posibles mutaciones de *splicing* en los genes *NIPBL* y *SMC3*, relacionados con el Síndrome Cornelia de Lange. Estas variaciones se localizaban en regiones intrónicas flanqueantes y aunque los métodos bioinformáticos facilitan la posible interpretación de sus efectos sobre el *splicing*, hay que validarlos experimentalmente, comprobando si se generan transcritos aberrantes.

Este objetivo general se subdivide en varios objetivos específicos:

1. Conocer y aplicar los criterios de clasificación clínica en pacientes con Síndrome Cornelia de Lange
2. Conocer las técnicas de diagnóstico genético en pacientes con SCdL
3. Conocer las técnicas de análisis de RNA en mutaciones de *splicing*
4. Aplicar estas técnicas al estudio de dos mutaciones de *splicing* en genes relacionados con SCdL: c.4560+4 A>G en el gen *NIPBL* y c.548-4_3dupTT en el gen *SMC3*

4. Material y Métodos

4.1. Historia clínica de los pacientes

Para el estudio de los pacientes con SCdL se utiliza una tabla estandarizada que lista las características fenotípicas que se deben estudiar. La tabla se adjunta en el ANEXO I.

4.2. Escalas de valoración de gravedad

Para la valoración de la gravedad clínica de los pacientes se ha empleado la escala elaborada por Gillis. Esta escala permite clasificar en Clase I (Leve), Clase II (Moderado) o Clase III (Grave) el grado de afectación en 3 parámetros medidos del SCdL: reducción en las extremidades, desarrollo y habilidades cognitivas, y crecimiento. Los criterios se elaboran en la tabla 1.

	Clase I (Leve)	Clase II (Moderado)	Clase III (Grave)
Reducción en extremidades	No hay defecto	Defecto parcial, oligodactilia (>2 dedos en cada mano)	Defecto severo (≤ 2 dedos en cualquier mano)
Desarrollo y habilidades cognitivas	Retraso <2 años en hitos madurativos; habilidades de comunicación y habla presentes	Retraso >2 años en hitos madurativos; comunicación y habla limitados	Retraso profundo en los hitos madurativos; incapacidad para la comunicación
Crecimiento*	Percentil > 75	Percentil 25-75	Percentil <25

Tabla 1: Tabla de clasificación de pacientes con SCdL elaborada por Gillis. (*)Se ha de calcular el promedio de los percentiles de talla/longitud, peso y perímetro cefálico con las tablas de crecimiento ajustadas para SCdL.

La clasificación de Kline es también fundamental en el estudio clínico del síndrome. Fue elaborada para detectar y graduar las alteraciones que se dan en el SCdL, estableciendo criterios clínicos mínimos para el diagnóstico y para valorar la gravedad.

Establece 2 combinaciones de criterios que son diagnósticas:

1. Sinofridia + 3 criterios secundarios craneofaciales + criterios necesarios de 2 de las categorías de: crecimiento, desarrollo físico o comportamiento.
2. Sinofridia + 3 criterios secundarios craneofaciales + criterios necesarios de 3 de las otras 6 categorías, siendo una de ellas obligatoriamente: crecimiento, desarrollo físico o comportamiento.

La lista completa de criterios se encuentra en el ANEXO II.

En cuanto a la gravedad, elaboró un sistema de puntuaciones para estimar el grado de afectación, pudiendo ser leve (< 15 puntos), moderado (15-22 puntos) o grave (> 22 puntos). El sistema de puntuación se presenta en la tabla 2.

	1 Punto	3 Puntos	5 Puntos
Peso al nacer	> 2.500 gr	2.000 – 2.500 gr	< 2.000 gr
Sedestación sin apoyo	< 9 meses	9 -20 meses	> 20 meses
Deambulaci3n independiente	< 18 meses	18-42 meses	> 42 meses
Edad de la primera palabra	< 24 meses	24-48 meses	> 48 meses
Malformaciones en EE.SS.	Sin defectos	Defecto parcial	Oligodactilia
Malformaciones mayores de otros 3rganos	0-1	2-3	> 3
Hipoacusia	Ausente	Leve	Moderada a grave

Tabla 2: Tabla de clasificaci3n de gravedad de pacientes con SCdL elaborada por Kline.

4.3. M3todos

El diagn3stico de mutaciones en el *splicing* implica realizar el estudio tanto a nivel del DNA gen3mico, para poder localizar la mutaci3n; como del mRNA, para averiguar qu3 efecto tiene dicha mutaci3n sobre el propio proceso *splicing* del mRNA.

4.3.1. Identificaci3n de la mutaci3n en el DNA

4.3.1.1. Extracci3n de DNA de sangre

A continuaci3n se explica el protocolo mediante el cual se obtiene DNA del paciente a partir de una muestra de sangre perif3rica del paciente.

1. Rotular con el c3digo del paciente la tapa y el lateral de los tubos FALCON de 50 ml. Esencial para evitar confusi3n de la muestra. Homogeneizar los tubos de sangre mediante inversi3n.
2. Separar 4 ml de sangre por cada tubo FALCON de 50 ml que se va a emplear.
3. Añadir 10 vol3menes de *Trit3n Sucrosa*, aproximadamente hasta 40 ml. Si el Trit3n no est3 fr3o, dejar los tubos en el congelador durante 5 min.
4. Sacar la *Proteinasa K* del congelador (1 eppendorf por cada 4 FALCON)

5. Centrifugar 10 min a 0° y 2.000 rpm.
6. Eliminar el sobrenadante por decantación.
7. Resuspender el pellet a 6ml de *tampón SE*.
8. Añadir 120 µl de *Proteinasa K* (10mg/ml). Incubar toda la noche a 37°C en estufa o 2-3 horas en baño a 55°C.
9. Añadir 2 ml de *NaCl 6M* y agitar.
10. Añadir 8 ml de *Cloroformo* (hasta 20 ml). Agitar en rotor durante 30 min.
11. Rotular tubos FALCON de 15 ml y eppendorf de 1,5 ml (DNA, paciente, fecha). Recoger el sobrenadante en los tubos FALCON de 15 ml (entre 6-7 ml).
12. Añadir *Isopropanol* 1:1. Mezclar por inversión hasta la aparición del ovillo de DNA.
13. Absorber el ovillo con micropipeta lo más rápido posible y pasarlo al eppendorf.
14. Añadir 1 ml de *Etanol 70%* del congelador
15. Agitar en rotor durante 30 min.
16. Centrifugar 5 min a 12.000 rpm.
17. Eliminar el etanol. Dejar secar el pellet a Tª ambiente unas 2-3 horas.
18. Añadir 300 µl de *buffer TE*. Dejarlo en la estufa a 37°C hasta que se disuelva

Una vez terminado este proceso disponemos de DNA del paciente, separado de elementos celulares y demás componentes de la sangre.

4.3.1.2. Diseño de *primers*

Como paso previo a la realización de la amplificación mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir de DNA genómico de los pacientes se diseñan unos *primers* o cebadores específicos para la zona a amplificar. Los *primers* son pequeñas cadenas de ácidos nucleicos que sirven como punto de inicio para la replicación del DNA. Para la amplificación por PCR son necesarios 2 *primers*, cada uno complementario a la secuencia de uno de los extremos del fragmento que se pretende replicar.

En el caso concreto del paciente 1, la pareja de *primers* que detectaron la secuencia alterada en de DNA fueron diseñados para amplificar la región comprendida entre el exón 20 y 21 de *NIPBL*. Para el paciente 2, los *primers* empleados amplificaban la región situada entre el exón 9 y el 10 de *SMC3*. La secuencia de los *primers* se muestra en las tablas 3 y 4.

Primer	Secuencia
F20	TTGGCAAACACAGTATCGTG
R21	GATCGCGCCACTGCACTC

Tabla 3: *Primers* empleados para amplificar el exón 21 de *NIPBL* en el paciente 1.

Primer	Secuencia
F9	TTGGGTTACCACATCACATC
R10	ATAGCAAGGACCACATGGC

Tabla 4: *Primers* empleados para amplificar el exón 9 de *SMC3* en el paciente 2.

4.3.1.3. Amplificación de exones por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, es una técnica de biología molecular que permite obtener, a partir de un fragmento de DNA, numerosas copias del mismo. La base de esta técnica es la capacidad de las DNA polimerasas de replicar hebras de DNA. El proceso alterna ciclos de altas y bajas temperaturas, que permiten que la DNA polimerasa replique el DNA, y que la doble cadena resultante se separe para poder ser replicada de nuevo.

En una sesión de amplificación por PCR se emplea un termociclador: un aparato que permite alternar cíclicamente entre varias temperaturas diferentes. En él tienen lugar aproximadamente 30-35 ciclos, cada uno de ellos consistente en 3 pasos a diferentes temperaturas. Inicialmente tiene lugar la etapa de desnaturalización, en la cual mediante altas temperaturas de 94-96°C se separan las dos cadenas de DNA. Es importante utilizar una DNA polimerasa termoestables, que no se desnaturalicen a la temperatura en la que se trabaja. Posteriormente, a una temperatura de 54-60°C, tiene lugar la hibridación del cebador. Los dos cebadores elegidos establecen uniones mediante puentes de hidrógeno con las secuencias complementarias en los extremos del exón, formando un marco a partir del cual se va a formar una nueva cadena. Finalmente, a 72°C tiene lugar la elongación o extensión de la cadena a partir de los *primers*, en dirección 5' → 3'.

Una vez concluidos los ciclos se mantiene la temperatura de extensión durante 5-10 minutos para asegurar que las hebras restantes estén bien elongadas. Además, en ocasiones, todo el proceso va precedido de una etapa de inicio a alta temperatura (98°C mantenidos 2-10 min) que permite la activación de la DNA polimerasa. La temperatura a la que se realiza el proceso es variable, dependiendo de ciertos parámetros, como el tipo de enzima usada, o la longitud del DNA a amplificar. El programa de ciclos de la PCR aparece en la tabla 5.

	Tiempo	Temperatura	
Inicio	2-10 min	98°C	
Desnaturalización	30 s	96°C	} x 35
Hibridación	30 s	54-60°C	
Extensión	30 s	72°C	
Extensión final	7 min	72°C	

Tabla 5: Programa para realizar la PCR.

En adición a los elementos previamente mencionados (DNA del paciente, DNA polimerasa y *primers*), hay otros componentes necesarios para la reacción: **desoxinucleótidostrifosfato (dNTPs)**, que son el sustrato a partir del cual se polimeriza el nuevo DNA; **iones divalentes** como el cloruro de magnesio, que actúan como cofactores de la polimerasa; una **solución tampón** para mantener el pH a un nivel al cual pueda actuar la polimerasa. En la PCR llevada a cabo, se emplea la mezcla *Master Mix*, que contiene el tampón, dNTPs, cloruro de magnesio y DNA polimerasa. La composición completa de la mezcla se lista en la tabla 6.

Reactivo	Volumen
Master Mix	10 µl
H2O libre de nucleasas	8,5 µl
Primer forward	0,5 µl
Primer reverse	0,5 µl
DNA	0,5 µl

Tabla 6: Mezcla empleada para realizar PCR.

4.3.1.4. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es un proceso que permite separar moléculas cargadas atendiendo a su peso molecular. El gel de agarosa es el medio a través del cual, una vez aplicado un campo eléctrico, migran las moléculas a diferente velocidad, permitiendo así la separación de las mismas. El DNA posee carga negativa, por lo cual en la electroforesis migrará hacia el polo positivo. De este modo los fragmentos más pequeños, es decir, con menor número de pares de bases, migrarán con mayor rapidez y se separarán de aquellos más pesados.

Para poder visualizar la muestra en el gel es necesario añadir bromuro de etidio, un producto que se intercala entre las hebras de DNA y es fluorescente si es expuesto a luz UV. Para poder estimar el tamaño de los fragmentos de DNA, se utiliza un marcador de peso molecular, que contiene fragmentos de DNA de tamaño conocido que nos servirá de escala. De este modo una vez realizada la electroforesis es posible ver diferentes bandas fluorescentes que pueden ser comparadas con un marcador de peso molecular para estimar cuantos pares de bases contienen.

La electroforesis del DNA estudiado se realizó en un gel de agarosa al 1% teñido de bromuro de etidio (BrEt), utilizando un voltaje de 90V durante 30 minutos. Su composición detallada se muestra en la tabla 7.

Reactivo	Cantidad
Tris-Borato-EDTA (TBE)	35 ml
Agarosa	0,53 g
BrEt	0,8 µl

Tabla 7: Composición del gel de agarosa para electroforesis.

Para determinar la masa molecular de los fragmentos analizados se comparó su movilidad con la de un marcador de pesos moleculares ya conocidos de 100 a 1.000 pb (100 pb DNA Ladder, de Fermentas).

4.3.1.5. Purificación del DNA

Para que el DNA pueda ser secuenciado es preciso purificarlo, esto es, eliminar el resto de componentes de la mezcla que han sido añadidos previamente. Para ello se ha empleado el método **ExoSAP-IT**, que permite eliminar los *primers* y dNTPs residuales mediante degradación enzimática con exonucleasa I y Shrimp Alkaline Fosfatasa respectivamente:

1. Colocar el tubo de ExoSAP-IT en un baño de hielo

2. Mezclar 5 µl de producto de PCR con 2 µl de ExoSAP-IT
3. Incubar 15 min a 37°C, para degradar los primers y dNTPs
4. Incubar 15 min a 80°C, para inactivar el ExoSAP-IT
5. Guardar el producto de PCR purificado a -20°C.

4.3.1.6. Secuenciación

Los productos de la PCR se envían a un centro externo: Sistemas Genómicos, en Valencia, España. Ahí son procesados mediante la Secuenciación Sanger. Esta reacción consiste en la identificación de desoxinucleótidos añadidos a los productos y marcados con fluoruros. Por convención internacional, se asigna el color verde a la adenina, el negro a la guanina, el rojo a la timina y el azul a la de citosina.

4.3.2. Análisis bioinformático del efecto de las mutaciones

Mediante el uso de programas bioinformático diseñados para detectar posibles sitios de *splicing*, se ha comparado la secuencia alterada del paciente 1 con la secuencia inalterada del gen *NIPBL*, calculando el valor consenso de los sitios de *splicing* alterados.

Las herramientas utilizadas han sido:

- Human Splicing Finder (HSF) version 3.0: <http://www.umd.be/HSF3/>
- Splice Site Prediction by Neural Network (SSPNN) del Berkeley Drosophila Genome Project: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
- Ensembl Genome Browser versión 84: <http://www.ensembl.org/index.html>

4.3.3. Estudio del mRNA

4.3.3.1. Extracción de RNA

El obtener RNA de las células de un paciente es un método complejo que conlleva una serie de inconvenientes, ya que es una molécula menos estable que el DNA y por lo tanto se degrada con mayor facilidad. Para facilitar este proceso, se emplean kits que facilitan su extracción, transporte, almacenamiento y posterior manipulación. En el caso del paciente 2 se obtuvo RNA a partir de leucocitos de sangre periférica mediante el **PAXgene Blood RNA Kit**, cuyo protocolo adaptado al laboratorio es el siguiente:

1. Centrifugar el tubo de sangre durante 10 min a 4000 rpm.
2. Eliminar el sobrenadante por pipeteo. Añadir 4 ml de agua *RNAase-free* al pellet y tapar el tubo con un nuevo tape.
3. Voltear hasta que el pellet se haya disuelto visiblemente y centrifugar durante 10 min a 4000 rpm. Posteriormente descartar el sobrenadante.

4. Añadir 350 µl de *Buffer (BR1)* y vortear hasta que el contenido del pellet esté visiblemente disuelto.
5. Pipetear la muestra en un eppendorf de 1.5 ml y añadir 300 µl de *Buffer (BR2)* y 40 µl de *proteínasa K*. Mezclar por vorteo durante 5 segundos e incubar 10 min a 55°C usando un shaker a 400-1400 rpm. Después poner el shaker a 65°C.
6. Pipetear el lisado en la PAXgene shredder spin column, colocada en un tubo de 2 ml, y centrifugar 3 min a máxima velocidad.
7. Transferir el eluido a un eppendorf limpio sin tocar el pellet.
8. Añadir 350 µl de *etanol 100%*, mezclar por vorteo y centrifugar muy brevemente (1-2 segundos) a 4000 rpm para que caigan las gotas que han quedado en la tapa del tubo. No excederse en el tiempo, ya que hay riesgo de que se estropee la muestra.
9. Pipetear 700 µl de la muestra en una PAX gene RNA spin column, situada en un tubo de 2 ml, y centrifugar 1 min a 13000 rpm. Colocar la columna en un nuevo tubo y descartar el usado.
10. Pipetear el resto de la muestra y repetir el proceso anterior (Paso 9)
11. Pipetear 350 µl de *Buffer de Lavado 1 (BR3)* en la columna. Centrifugar 1 min a 13000 rpm. Colocar la columna en un nuevo.
12. Preparar mezcla de incubación: añadir 10 µl de *DNAasa I* en solución a 70 µl de *Buffer de Digestión (RDD)*. Mezclar suavemente y dar un spin.
13. Pipetear los 80 µl de la mezcla de incubación, añadirlos a la columna y dejar 15 min a Tª ambiente.
14. Pipetear 350 µl de *Buffer de Lavado 1 (BR3)* en la columna. Centrifugar 1 min a 8000-20000 rpm. Colocar la columna en un nuevo tubo.
15. Pipetear 500 µl de *Buffer de Lavado 2 (BR4)* en la columna. Centrifugar 1 min a 8000-20000 rpm. Colocar la columna en un nuevo tubo.
16. Añadir otros 500 µl de *Buffer de Lavado 2 (BR4)*. Centrifugar 3 min a 8000-20000 rpm. Colocar la columna en un nuevo tubo.
17. Desechar el tubo y poner la columna en un tubo nuevo. Centrifugar 1 min a 8000-20000 rpm.
18. Desechar el tubo. Colocar la columna en un tubo de 1.5 ml y pipetear 50 nuevo tubo. de *Elution Buffer (BR5)* o *H2O RNAase-free* en la membrana. Centrifugar 1 min a 13000 rpm.
19. Se repite el Paso 18.
20. Incubar 5 min a 65°C e inmediatamente poner en hielo. Guardar el RNA a -80°C.

4.3.3.2. RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) es una técnica que permite obtener a partir de una hebra de RNA copias de cDNA, gracias a la acción de la transcriptasa reversa. Esto otorga una serie de ventajas, ya que el DNA es una molécula más estable que el RNA lo cual facilita su estudio. Para ello se usó el First Strand cDNA Synthesis Kit, de Fermentas:

1. Asegurarse de preservar en hielo el RNA y ciertos reactivos durante el proceso
2. Preparar la *mezcla 1*
3. Incubar 5 min a 65°C.
4. Añadir el resto de reactivos (Mezcla 2)
5. Incubar 5 min a 25°C, 60 min a 60°C y 5 min a 70°C.

Reactivo	Volumen
RNA	4.7 µl
Hexámeros Random	1 µl
Agua	5.3 µl

Tabla 8: Mezcla 1 de la RT-PCR.

Reactivo	Volumen
Buffer x5	4 µl
Inhibidor de la RNAasa	1 µl
dNTPs (10mM)	2 µl
Transcriptasa reversa	2 µl

Tabla 9: Mezcla 2 de la RT-PCR.

Posteriormente es necesario llevar a cabo una PCR para aumentar el número de copias de cDNA, que difiere ligeramente de la anteriormente explicada en el estudio del DNA genómico. Los detalles de composición de los reactivos y de tiempos se muestran en las tablas 10 y 11 respectivamente:

Reactivo	Volumen
Master Mix	10 µl
H2O libre de nucleasas	7µl
Primer forward	0.5 µl
Primer reverse	0.5 µl
DNA	1.5 µl

Tabla 10: Mezcla empleada para realizar RT-PCR

	Tiempo	Temperatura
Inicio	5 min	98°C
Desnaturalización	30 s	96°C
Hibridación	30 s	56°C
Extensión	40 s	72°C
Extensión final	7 min	72°C

Tabla 11: Programa de la RT-PCR.

Los *primers* empleados son diferentes para cada paciente, puesto que se pretende clonar el cDNA de manera parcial, buscando una región que englobe los exones potencialmente afectados. En el caso del paciente 1 se amplifica la región comprendida por los exones 19 y 24 de *NIPBL*, y en el paciente 2 los exones 7 y 11 de *SMC3*.

Primer	Secuencia
sF19	AATGTCAGTGAAGTACAGTTG
sR24	CTTGTTAGTCAACTGATGAAC

Tabla 12: *Primers* empleados para amplificar los exones 19 a 24 de *NIPBL* en el paciente 1.

Primer	Secuencia
SF7	GATGAACCTCCTTGAAAGCG
SR11	CTGCTCTTGTCTTTCAGCAC

Tabla 13: *Primers* empleados para amplificar los exones 7 a 11 de *SMC3* en el paciente 2.

4.3.3.3. Electroforesis

De la misma manera que se ha explicado con anterioridad, separaremos los fragmentos de cDNA amplificado atendiendo a su número de pares de bases mediante electroforesis en gel de agarosa. Esta vez, además de evidenciar la existencia de varias cadenas de diferente peso molecular, nos permite separarlas físicamente para ser estudiadas independientemente.

4.3.3.4. Purificación del cDNA

Una vez el cDNA ha sido separado en el gel de agarosa mediante electroforesis, y se ha aislado la banda de cDNA que nos interesa estudiar, ésta se puede apartar del gel mediante un proceso de purificación. Para ello se ha empleado el Quiaquick Gel Extraction Kit:

1. Cortar el fragmento de cDNA del gel de agarosa, intentando que el fragmento incluya el mínimo gel sin cDNA posible.
2. Pesar el gel y añadir 3 volúmenes de *Buffer QG* por cada volumen de gel.
3. Incubar a 50°C durante 10 min o hasta que el gel se disuelva completamente. Para ayudar al proceso se puede mezclar el tubo por inversión cada 2-3 min.
4. Verificar que el color de la mezcla sea amarillo. Si la muestra es de color naranja o violeta, añadir 10 µl de *Acetato de Sodio* 3M a pH 5 y mezclar.
5. Añadir tantos µl de *Isopropanol* como mg de gel hemos pesado anteriormente.
6. Colocar la mezcla en una columna y centrifugar durante 1 min a 13000 rpm.
7. Descartar el eluido y añadir 500 µl de *Buffer QG* (Opcional, pero recomendable si se va a hacer secuenciación directa, transcripción in vitro o microinyección). Centrifugar durante 1 min a 13000 rpm.
8. Descartar el eluido y lavar añadiendo 750 µl de *Buffer PE*, y centrifugar durante 1 min a 13000 rpm.
9. Descartar el eluido y volver a centrifugar durante 1 min a 13000 rpm.
10. Colocar el tubo en un eppendorf limpio y eluir el DNA con 40 µl de agua miliQ o libre de RNAasa y DNAasa. Centrifugar durante 1 min a 13000 rpm.

4.3.3.5. Secuenciación de cDNA

Empleando una técnica idéntica a la del DNA genómico, se enviaron las muestras para su secuenciación.

5. Resultados

5.1. Historia clínica de los pacientes

5.1.1. Paciente 1

Niña de 5 años diagnosticada a los 16 meses de SCdL. Presenta rasgos del fenotipo característico y alteraciones musculoesqueléticas en las extremidades. Se aprecia un retraso en la adquisición del lenguaje e importantes dificultades para la alimentación, lo cual ha supuesto la necesidad de gastrostomía.



Figura 5: Imágenes de la paciente 1 con mutación en *NIPBL* a los: a y b) 21 meses, c) 3 años y 10 meses, d) 4 años y 10 meses.

Crecimiento						
Edad	Peso		Talla (o Longitud)		Perímetro Cefálico	
Parto	1.960 kg	P25-50	44,2 cm	P10-25	31 cm	P10-25
1 año y 9 meses	11.200 kg	P25-50	81 cm	P25	46,3 cm	P25-50
3 años y 10 meses	15.600 kg	P25-50	100 cm	P25-50	50 cm	P50-75
4 años y 10 meses	16.500 kg	P3-25	103 cm	P25	46 cm	P50-75

Desarrollo psicomotor y conducta	
Discapacidad intelectual Desarrollo psicomotor acorde a la normalidad Retraso en la adquisición del lenguaje No alteraciones del comportamiento/personalidad	
Otras Manifestaciones	
Cráneo	Cabello de inserción anterior baja
Ojos	Cejas arqueadas Sinofridia Pestañas largas
Nariz	Puente nasal discretamente deprimido Narinas antevertidas Philtrum largo y liso
Boca	Labio superior delgado Paladar alto Diastema dentario Retraso de la dentición Micrognatia
Cuello	Cabello de inserción posterior baja
Gastrointestinal	Trastorno de la deglución Necesidad de gastrostomía por inapetencia
Musculoesquelético	Manos - Manos pequeñas - Inserción proximal del pulgar - Clinodactilia del 5º dedo
	Pies - Pies pequeños - Sindactilia del 2º-3º dedo
	Limitación en la movilidad de los codos por luxación de cabeza del radio
Piel	Hirsutismo

Tabla 14: Datos clínicos de la paciente 1.

5.1.2. Paciente 2

Niña de 3 años que presenta destaca por presentar desarrollo psicomotor y de adquisición del lenguaje acorde con la edad (salvo una mala pronunciación), y la somatometría no correspondiente a SCdL. Sin embargo, se aprecian rasgos característicos de manera aislada, como la sinofridia y la microcefalia ya desde el nacimiento.



Figura 6: Imágenes de la paciente 2 con mutación en SMC3.

Crecimiento					
Edad	Peso		Talla (o Longitud)		Perímetro Cefálico
Parto	3.030 kg	P50	49,5 cm	P50-75	32 cm P10-25
1 año	6.950 kg	P <3	72,5 cm	P25-50	42,9 cm P <2
1 año y 5 meses	7.600 kg	P <3	77,5 cm	P25	44,5 cm P2
2 años y 7 meses	10.800 kg	P <3	88,5 cm	P25	46,,5 cm P2
Desarrollo psicomotor y conducta					
Lenguaje normal, con mala pronunciación					
Otras Manifestaciones					
Cráneo	Microcefalia Cabello de inserción anterior baja				
Ojos	Ligera sinofridia Pestañas largas Escleras azuladas				
Boca	Paladar ligeramente elevado				
Cardiovascular	CIA (Ya cerrada a los 2 años y 7 meses)				
Musculoesquelético	Hiperlaxitud articular Ligera hipotonía Clinodactilia bilateral del 5º dedo de los pies				
Piel	Dermatografismo				

Tabla 15: Datos clínicos de la paciente 2.

Desde los 4 meses de vida se refiere una pérdida de apetito que se traduce en una importante pérdida de peso. Con regularidad hace deposiciones de heces pastosas y malolientes y que sólo cuando las deposiciones se vuelven normales es cuando se aprecia ganancia ponderal.

En el 2014, en el contexto de un cuadro de gastroenteritis aguda padeció 3 crisis convulsivas.

5.2. Aplicación de la clasificación de Gilis

El paciente 1 presenta un fenotipo leve (Clase 1 de Gillis). Presenta discapacidad intelectual y un retraso en la adquisición del lenguaje, si bien el retraso en los hitos madurativos es menor a 2 años. No se aprecian defectos en sus extremidades y el percentil promedio de su peso, talla y perímetro cefálico supera el p75, de hecho, todos se encuentran por encima de los rangos percentilados para el SCdL.

El paciente 2 también se clasificaría como un fenotipo leve. En este caso el desarrollo psicomotriz es prácticamente normal, salvo por un trastorno de la pronunciación. No presenta defectos en extremidades y el percentil promedio de su peso, talla y perímetro cefálico, pese a la microcefalia, se encuentra por encima del p75.

5.3. PCR y electroforesis en gel de agarosa

Mediante PCR se amplificaron las regiones de DNA genómico delimitadas por los *primers*. Mediante electroforesis en gel de agarosa se verificaron las bandas que producía el producto de la PCR del paciente, comparándolas con la de sus padres. En ambos pacientes se visualizó una banda coincidente en peso molecular con la de los progenitores. La banda del paciente 1, que contiene el exón 21 de *NIPBL*, tenía aproximadamente 250 pb. En el caso del paciente 2, la banda que amplificaba el exón 9 de *SMC3* tenía 490 pb.

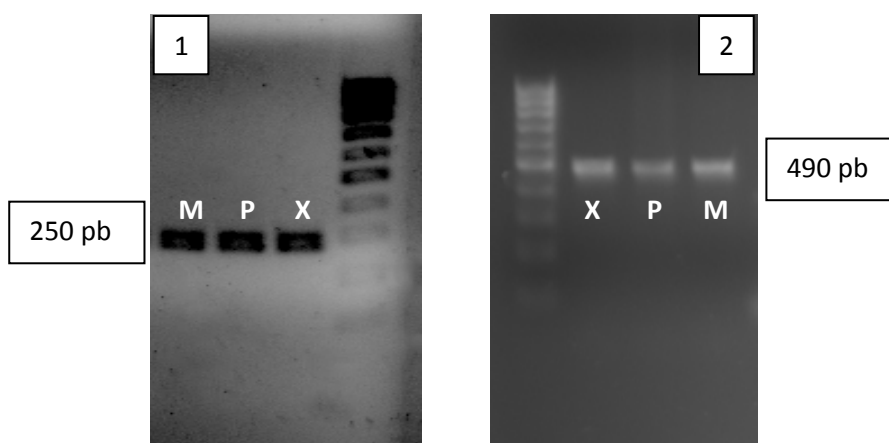


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa de la PCR de los pacientes. En la del paciente 1 (1) corresponde con el exón 21 de *NIPBL*, de 250 pb. En la del paciente 2 (2) corresponde con el exón 9 de *SMC3*, de 490 pb. Las bandas corresponden a madre (M), padre (P) y paciente (X).

5.4. Mutaciones en el DNA genómico

Los productos de PCR fueron enviados para secuenciar a Sistemas Genómicos, en Valencia. Una vez obtenidos los resultados se comparan con una secuencia control correspondiente a la misma región del gen.

En el paciente 1 se identificó una variante **c.4560+4A>G** en el **intrón 21** de **NIPBL** en heterocigosis. Esta mutación supone la transición de una adenina a una guanina en el sitio dador del splicing del intrón 21. Al ser una mutación en heterocigosis, en la secuenciación se identificó tanto adenina, como guanina.

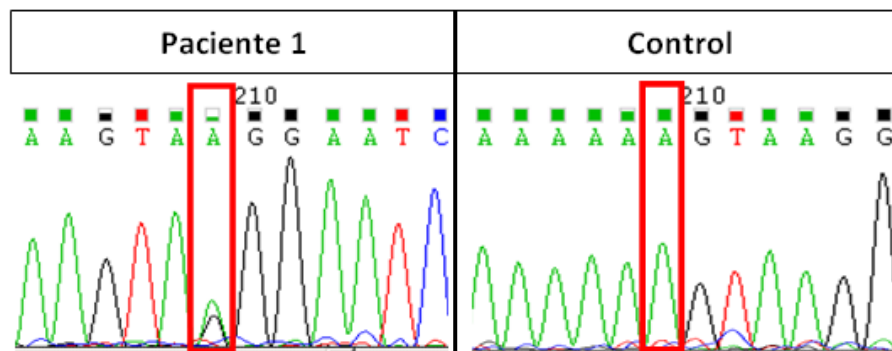


Figura 8: Secuencia del intrón 21 de **NIPBL** del paciente 1, comparado con una secuencia de control. Marcado en rojo: posición en la que se da la transición A>G.

En el paciente 2 se identificó una variante **c.548-4_-3dupTT** en el **intrón 8** de **SMC3** en heterocigosis. Al producirse una duplicación en heterocigosis, desde la posición dónde sucede en adelante en la secuenciación se detectaron bandas que correspondientes a distintas bases. Esto se debe a que las dos dotaciones del gen **SMC3** del paciente, debido a la duplicación, son reconocidas por el secuenciador en desfase.

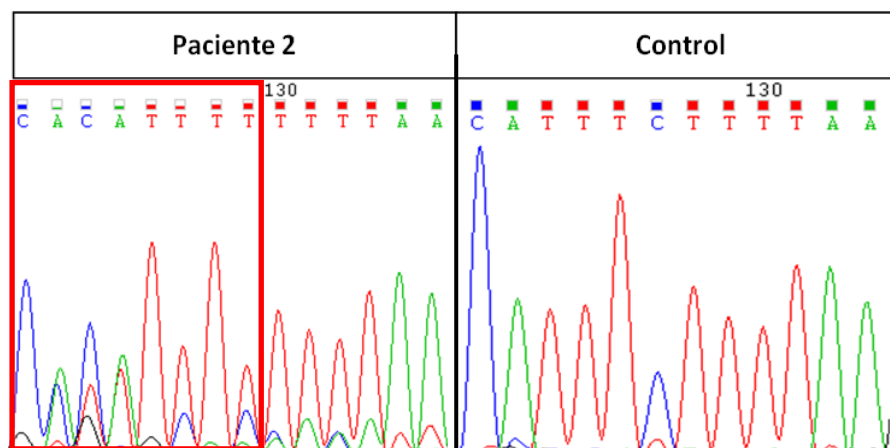


Figura 9: Secuencia del intrón 8 de **SMC3** del paciente 2, comparado con una secuencia de control. Marcado en rojo: secuencia que se ve alterada por la duplicación.

5.5. Resultados del análisis bioinformático

Las herramientas web utilizadas han permitido localizar y comparar la región afectada en el paciente 1 con la secuencia correspondiente inalterada del gen *NIPBL*. De esta manera se pretende predecir el impacto de la mutación c.4560+4A>G sobre el proceso de *splicing*. Los resultados se muestran en la tabla 16:

	Wild Type (AAAGTAAGG)	c.4560+4A>G (AAAGTAGGG)
HSF	86,53	78,19
SSPNN	0,93	0,14

Tabla 16: Predicciones de las herramientas bioinformáticas HSF y SSPNN

El análisis muestra unos resultados contradictorios. SSPNN predice una pérdida importante en la funcionalidad como sitio donante del *splicing*, mientras que en HSF la diferencia es considerablemente menor.

5.6. Identificación de transcritos aberrantes en gel de agarosa

Una vez obtenido el cDNA mediante RT-PCR, se realiza una electroforesis en gel de agarosa junto a una muestra de control para poder diferenciar los transcritos inalterados con transcritos aberrantes, por su diferente peso molecular.

En la electroforesis de cDNA del paciente 1 se aprecian dos bandas: una de ellas correspondiente con el transcrito presente en el control de 522 pb, y otra compatible con un transcrito alterado de 383 pb, un peso molecular 139 pb menor. De esta manera, se confirma la repercusión de la mutación sobre el *splicing*.

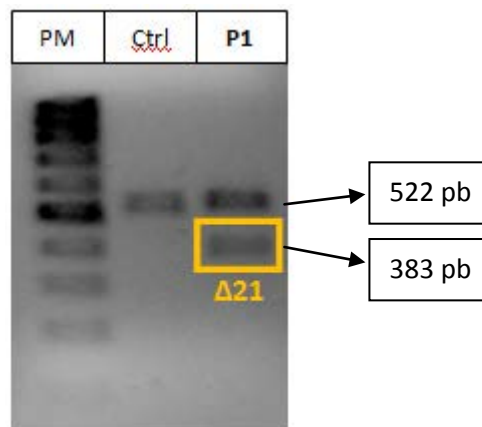


Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa de cDNA del paciente 1 comparada con un control. Se detecta una banda no presente en el control, de menor peso molecular.

En el paciente 2 no se aprecian diferencias significativas en la banda obtenida a partir del cDNA respecto del control. En ambos se obtiene una banda de 522 pb, lo que indica que la mutación no tiene efecto sobre el *splicing*.

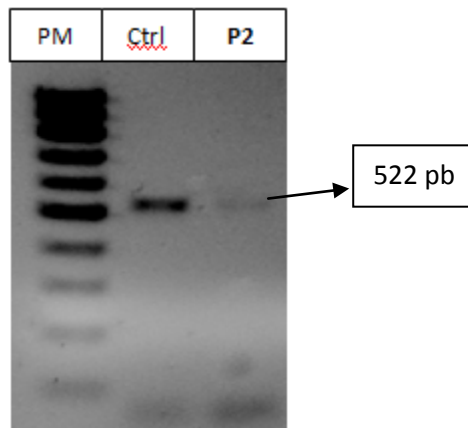


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa de cDNA del paciente 2 comparada con un control. No se detectan diferencias.

5.7. Secuenciación del cDNA

En la secuencia del cDNA del paciente 1 se confirma que la mutación produce la pérdida del exón 21.

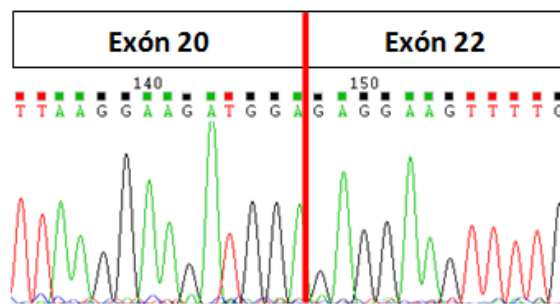


Figura 12: Secuenciación de cDNA del gen *NIPBL* del paciente 1. Marcado en rojo: punto de separación entre el exón 20 y 21, estando el 21 ausente.

En el caso del paciente 2, se confirma que la secuencia de exones se mantiene indemne, confirmando que la mutación en el intrón 8 no tiene efecto sobre el *splicing*.

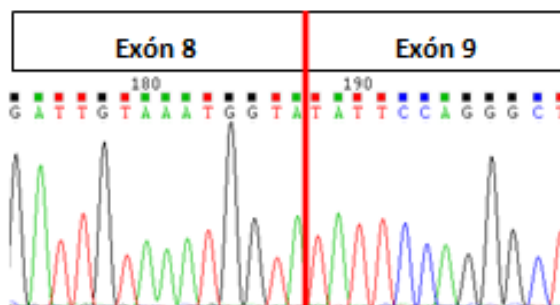


Figura 13: Secuenciación de cDNA del gen *SMC3* del paciente 2. Marcado en rojo: punto de separación entre el exón 8 y 9. Sin alteraciones.

6. Discusión

En este trabajo se caracterizan dos posibles mutaciones intrónicas en dos pacientes con Síndrome Cornelia de Lange. Las mutaciones se localizan en dos de los genes causales del síndrome, *NIPBL* y *SMC3*.^{15,25} El objetivo que se pretende es describir si realmente alteran el *splicing* y si es posible establecer relaciones genotipo-fenotipo.

El Síndrome de Cornelia de Lange es una patología de difícil diagnóstico, debido su heterogeneidad clínica y genética, pues puede estar causado por mutaciones en múltiples genes involucrados en la formación y/o regulación del anillo de cohesinas.⁹ El diagnóstico a partir del DNA genómico puede requerir pues un trabajo exhaustivo, en el caso además de variaciones de secuencia intrónica, es necesario un estudio añadido en el RNA del paciente para confirmar si afecta al proceso de *splicing*.

En la actualidad, se han reportado varios casos de SCdL producidos por una mutación que afecta al *splicing*, tanto del gen *NIPBL* como del *SMC3*. Este tipo de mutaciones suponen el 17% de las descritas en *NIPBL*. Recientemente se identificaron las primeras mutaciones de *splicing* en *SMC3*.²⁶

El paciente 1 se corresponde con un fenotipo leve de SCdL, con rasgos faciales (sinofridia, cejas arqueadas, philtrum largo, labio fino, narinas antevertidas) y de afectación leve de extremidades (manos y pies pequeñas, braquiclinodactilia del 5º dedo) típicos del síndrome. Cabe destacar que el paciente tiene problemas nutricionales debido a inapetencia, que han supuesto la necesidad de una gastrostomía para permitir la alimentación. Si bien en el SCdL las alteraciones gastrointestinales son frecuentes, predominando el reflujo gastroesofágico²⁷ llama la atención que en este caso no se deban a manifestaciones más clásicas, sino a una inapetencia de la que se desconoce el origen.

El estudio genético reveló que presentaba una variación **c.4560+4A>G** en el **intrón 21** del gen ***NIPBL*** en heterocigosis. Esta mutación supone la transición de una adenina a una guanina en el sitio dador del *splicing* del intrón 21. El análisis bioinformático usando la herramienta SSPNN predecía como consecuencia de la mutación, una disminución drástica de la fortaleza de la secuencia donadora de *splicing*. La mayoría de las mutaciones intrónicas comunicadas en la literatura afectan a la zona dadora 5' más que a las aceptora 3'. También es más frecuente que la mutación produzca la omisión del exón precedente, en vez de formar secuencias crípticas.^{23,24} Esto concuerda con lo descrito en el paciente 1. Lo que no es tan frecuente es que la mutación se situé en la posición +4, siendo más frecuente que se produzca en la posición +1 o +2. Un ejemplo de un caso reportado en el que una mutación de transición A>G en posición +4 del sitio dador produce la omisión del exón precedente se ha descrito en el estudio de la catarata congénita autosómica recesiva, en el gen *HSF4*.²⁸

El estudio a nivel de RNA mostró que se producía un transcrito aberrante con pérdida del exón 21, provocando una alteración en la pauta de lectura que genera un codón de stop 66 aminoácidos más adelante. El gen *NIPBL* se compone de 47 exones. Sabiendo que la alteración del marco de lectura produce un codón de stop 66 aminoácidos después de la omisión del exón 21. Esto supone la pérdida de los 5 dominios HEAT, regiones que permiten que *NIPBL*

interactúe con otras proteínas.¹ Por esto, cabe esperar que la proteína resultante no sea funcional.

Se ha reportado que las mutaciones de *splicing* en el gen *NIPBL* que generan transcritos que rompen el marco de lectura suelen relacionarse con fenotipos graves, y aquellas que no lo hacen, con casos más leves.²⁴ Sin embargo, las manifestaciones clínicas observadas en pacientes con mutaciones en el *splicing* son muy variables en el SCdL. En este caso dado que el transcrito aberrante generado rompe la pauta de lectura, cabría esperar que el paciente presentase un fenotipo grave, y sin embargo ha sido identificado como leve.

El paciente 2 presenta una clínica compatible con un Cornelia leve, si bien se identifican algunos rasgos típicos: ligera sinofridia, pestañas alargadas, clinodactilia del 5º dedo de los pies y otros menos específicos: hipotonía, microcefalia, hiperlaxitud, paladar elevado. Su somatometría no corresponde con un SCdL típico y manifiesta alteraciones que no se suelen asociar al síndrome: dermatografismo, conjuntivas azuladas, alteraciones del ritmo deposicional.

En este paciente se le detectó una variante **c.548-4_-3dupTT** en el **intrón 8** de **SMC3** en heterocigosis. Esta variante posiblemente podría estar afectando a la secuencia rica en pirimidinas, que es una de las secuencias reguladoras del *splicing*. Sin embargo, en el estudio del cDNA se determinó que la mutación no afectaba al proceso de *splicing*, puesto que no generaba transcritos aberrantes. Posteriormente se determinó que esta variante había sido heredada de un padre sano. En esta paciente ya se habían estudiado con anterioridad los genes *NIPBL* y *SMC1A*, y ante la negatividad del estudio actual se está investigando en *RAD21* y *HDAC8*.

Se trata de un caso que representa muy bien la metodología en el diagnóstico genético del SCdL. Se estima que en un 30% de los pacientes con SCdL se desconoce la causa genética.²⁹ A medida que se siguen examinando casos y estudiando las posibles alteraciones responsables, se descubren nuevos mecanismos y genes que producen la enfermedad. Este caso también apoya la idea de que es importante estudiar experimentalmente el efecto de las variantes intrónicas, sobre todo si se sitúan en regiones reguladoras del *splicing*, para ver si son o no causantes del síndrome.²⁹ El hecho de evidenciarlas en DNA genómico, como se ha visto en este caso, no implica necesariamente una alteración del proceso de *splicing* ni, por lo tanto, la funcionalidad de la proteína codificada.

7. Conclusiones

1. Se confirma que la mutación c.4560+4A>G en el intrón 21 del gen *NIPBL* que afecta a secuencia conservada donadora de intrón es una mutación de *splicing*
2. Se demuestra que la mutación c.4560+4A>G produce un transcrito aberrante con pérdida del exón 21 y ruptura de la pauta de lectura pero con fenotipo leve
3. El estudio de la variante c.548-4_-3dupTT del gen *SMC3*, demuestra que no genera transcritos aberrantes y por tanto no es una mutación de *splicing*
4. Es importante estudiar experimentalmente el efecto de las variantes intrónicas, sobre todo si se sitúan en regiones reguladoras del *splicing*, para ver si son o no causantes del síndrome

8. Bibliografía

1. Mannini L, Cucco F, Quarantotti V, et al. Mutation Spectrum and Genotype-Phenotype Correlation in Cornelia de Lange Syndrome. *Hum Mutat*. 2013;34(12).
2. Ramos FJ, Puisac B, Baquero-Montoya C, et al. Clinical utility gene card for: Cornelia de Lange syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(10).
3. Cheung K. Cornelia de Lange Syndrome. *J Hand Surg Am*. 2015; 40(12): 2501-3.
4. Gil MC, Ribate MP, Ramos FJ. Síndrome de Cornelia de Lange. *Protoc diagn ter pediatr*. 2010;1:1-12.
5. Bhuiyan ZA, Klein M, Hammond P, et al. Genotype-phenotype correlations of 39 patients with Cornelia De Lange syndrome: the Dutch experience. *J Med Genet*. 2006;43:568–75.
6. Kline AD, Krantz ID, Sommer A, Kliever M, Jackson LG, FitzPatrick DR, et al. Cornelia de Lange syndrome: clinical review, diagnostic and scoring systems, and anticipatory guidance. *Am J Med Genet A*. 2007;143:1287-96.
7. Gillis LA, McCallum J, Kaur M, DeScipio C, Yaeger D, Mariani A et al. NIPBL mutational analysis in 120 individuals with Cornelia de Lange syndrome and evaluation of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet*. 2004;75:610-23.
8. Bose T, Gerton JL. Cohesinopathies, gene expression, and chromatin organization. *J Cell Biol*. 2010;189(2):201-10.
9. Mehta GD, Kumar R, Srivastava S, et al. Cohesin: Functions beyond sister chromatid cohesion. *FEBS Letters*. 2013;587:2299-312.
10. Mannini L, Lamaze FC, Cucco F, et al. Mutant cohesin affects RNA polymerase II regulation in Cornelia de Lange syndrome. *Sci Rep*. 2015;5:16803.
11. Ball Jr. AR, Chen Y, Yokomori K. Mechanisms of cohesin-mediated gene regulation and lessons learned from cohesinopathies. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1839(3):191–202.
12. Boyle MI, Jespersgaard C, Brøndum-Nielsen K, et al. Cornelia de Lange syndrome. *Clin Genet*. 2015;88:1–12.
13. Skibbens RV, Colquhoun JM, Green MJ, et al. Cohesinopathies of a Feather Flock Together. *PLoS Genet*. 2013;9(12).
14. Jang M-L, Lee C-W, Kim J-K, et al. Novel Pathogenic Variant (c.3178G>A) in the SMC1A Gene in a Family With Cornelia de Lange Syndrome Identified by Exome Sequencing. *Ann Lab Med*. 2015;35(6):639-42.
15. Gil-Rodríguez MC, Deardorff MA, Ansari M, et al. De novo heterozygous mutations in SMC3 cause a range of Cornelia de Lange syndrome-overlapping phenotypes. *Hum Mutat*. 2015;36(4):454-62.
16. Kaiser FJ, Ansari M, Braunholz D, et al. Loss-of-function HDAC8 mutations cause a phenotypic spectrum of Cornelia de Lange syndrome-like features, ocular hypertelorism, large fontanelle and X-linked inheritance. *Hum Mol Gen*. 2014; 23(11):2888-900.

17. Deardorff MA , Wilde JJ, Albrecht M, et al. RAD21 Mutations Cause a Human Cohesinopathy. *Am J Hum Genet.* 2012; 90:1014-27.
18. Hang J, Wan R, Yan C, Shi Y. Structural basis of pre-mRNA splicing. *Science.* 2015;349: 1191-98.
19. Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell.* 2009;136:701-18.
20. Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 2003;17:419–37.
21. Wang G-S, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the machinery. *Nat Rev Genet.* 2007;8(10):749-61.
22. Caminsky N, Mucaki E, Rogan P. Interpretation of mRNA splicing mutations in genetic disease: review of the literature and guidelines for information-theoretical analysis. *F1000Research.* 2014.
23. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to Silence and Understanding Nonsense: Exonic Mutations that Affect Splicing. *Nature Rev Genet.* 2002;3:285-98.
24. Teresa-Rodrigo M, Eckhold J, Puisac B, et al. Functional Characterization of NIPBL Physiological Splice Variants and Eight Splicing Mutations in Patients with Cornelia de Lange Syndrome. *IJMS.* 2014;15(6):10350-10364.
25. Krantz ID, McCallum J, DeScipio C, et al. Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nat Genet.* 2004;36(6):361-5.
26. Yuan B, Pehlivan D Karka E, et al. Global transcriptional disturbances underlie Cornelia de Lange syndrome and related phenotypes. *J Clin Invest.* 2015;125(2):636–651.
27. Luzzani S, Macchini F, Valadè A, et al. Gastroesophageal reflux and Cornelia de Lange syndrome: typical and atypical symptoms. *Am J Med Genet A.* 2003;119A(3):283-7.
28. Smaoui N, Beltaief O, BenHamed S, et al. A Homozygous Splice Mutation in the HSF4 Gene Is Associated with an Autosomal Recessive Congenital Cataract. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2004;45(8):2716.
29. Teresa-Rodrigo ME, Eckhold J, Puisac B, et al. Identification and Functional Characterization of Two Intronic NIPBL Mutations in Two Patients with Cornelia de Lange Syndrome. *BioMed Research International.* 2016;2016:1-8.

Anexos

Anexo 1: Tabla estandarizada de evaluación del SCdL

FECHA	IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE:	
	HALLAZGOS CLINICOS	RESPONDA SI/ NO ó descripción breve
	SEXO	
	EDAD	
	FECHA DE NACIMIENTO	
CRANEO	MICROCEFALIA	
	BRAQUICEFALIA	
	LINEA DE INSERCIÓN DEL CABELLO ANTERIOR BAJA	
	EDAD DE CIERRE DE LA FONTANELA ANTERIOR	
	OTRAS	
OJOS	CEJAS ARQUEADAS	
	SINOFRIDIA	
	PESTAÑAS LARGAS	
	PTOSIS	
	MIOPIA	
	OBSTRUCCIÓN DEL CONDUCTO LACRIMAL	
	OTROS	
NARIZ	PUENTE NASAL DEPRIMIDO	
	NARINAS ANTEVERTIDAS	
	PHILTRUM LARGO Y LISO	
BOCA	LABIO SUPERIOR DELGADO	
	BOCA EN CARPA	
	PALADAR ALTO	
	PALADAR HENDIDO	
	ANOMALIAS DENTALES	
	MICROGNATIA	
	OTROS	
ORL	HIPOACUSIA/ SORDERA	
	OTITIS/ SINUSITIS/ AMIGDALITIS A REPETICIÓN	
CUELLO	LINEA DE INSERCIÓN DE CABELLO POSTERIOR BAJA	
CARDIOVASCULAR	CARDIOPATIA CONGENITA	

PULMONAR	APNEAS	
	INFECCIONES RESPIRATORIAS RECURRENTES	
	OTRAS	
GASTROINTESTINAL	REFLUJO GASTROESOFAGICO PATOLOGICO	
	PROBLEMAS CON LA ALIMENTACION/SUCCION	
GENITOURINARIO	MALFORMACIONES RENALES	
	REFLUJO VESICoureTERAL	
	MALFORMACIONES UTERINAS/OVARIOS	
	CRIPTORQUIDIA	
	HIPO/EPISPADIAS	
	OTROS	
EXTREMIDADES	MANOS PEQUEÑAS	
	INSERCIÓN PROXIMAL DEL PULGAR	
	CLINODACTILIA DEL 5º DEDO	
	PLIEGUE PALMAR UNICO	
	PIES PEQUEÑOS	
	SINDACTILIA DE LOS DEDOS DEL PIE	
	DEFECTOS DE REDUCCION DE EXTREMIDADES	
	LIMITACION PARA EL MOVIMIENTO DE LOS CODOS	
	OTROS	
PIEL	HIRSUTISMO	
	CUTIS MARMORATA	
	OTROS	
SNC	ANOMALIAS ESTRUCTURALES EN SNC (ECO, TAC, RNM)	
	CONVULSIONES	
	OTRAS	
MENTAL / COGNITIVO	DISCAPACIDAD INTELECTUAL	
	ALTERACIONES DE COMPORTAMIENTO/PERSONALIDAD	
DESARROLLO	DESARROLLO DEL LENGUAJE	
	EDAD PRIMERA PALABRA	
	DESARROLLO MOTOR	
	EDAD SENTARSE SOLO	
	EDAD CAMINAR SOLO	

DATOS ANTROPOMETRICOS	EDAD GESTACIONAL	
NACIMIENTO	PESO AL NACER (g)	
	LONGITUD AL NACER (cm)	
	PERIMETRO CEFALICO (cm)	
DATOS ACTUALES	EDAD DE LA VALORACIÓN	
	PESO (kg)	
	TALLA (cm)	
	PERIMETRO CEFALICO (cm)	
DATOS GENÉTICOS	GEN AFECTADO	
	MUTACION/ VARIANTE	
	EFEECTO EN LA PROTEÍNA	
GRAVEDAD CLINICA	Leve	

Tabla 17: Tabla estandarizada de evaluación de SCdL

Anexo 2: Tabla de criterios diagnósticos del SCdL de Kline

CATEGORÍA	nº	CRITERIO PRINCIPAL	CON	CRITERIO SECUNDARIO
Craneofacial		- Sinofridia (cejas finas y arqueadas)	y ≥ 3 de	- Pestañas largas - Nariz pequeña y narinas antevertidas - Filtrum largo y prominente - Puente nasal ancho y deprimido - Barbilla pequeña y cuadrada - Labios finos y comisuras hacia abajo - Paladar elevado - Diastema
Crecimiento	≥ 2 de	- Peso < del 5º percentil según la edad - Altura o talla < del 5º percentil según la edad - Perímetro cefálico por debajo < del 5º percentil según la edad		
Desarrollo	≥ 1 de	- Retraso del desarrollo o mental - Dificultades de aprendizaje		
Comportamiento	≥ 2 de	- Déficit de atención +/- hiperactividad - Comportamiento obsesivo-compulsivo - Ansiedad - Agresividad - Comportamiento autolesivo - Timidez extrema - Rasgos autistas		
Extremidades	o o	- Defectos de reducción con ausencia de antebrazos - Manos y/o pies pequeños (por debajo del percentil 3) u oligodactilia - Ninguna de las anteriores	Solo y ≥ 2 de y ≥ 3 de	- Clinodactilia 5º dedo - Línea palmar anormal - Extensión anormal de codo - 1º metacarpiano corto/localización proximal de los pulgares - Deformidades en los dedos de los pies - Sindactilia en el 2º y 3º dedo del pie - Escoliosis - Pectus excavatum - Displasia o dislocación de cadera
Neurosensorial / piel	≥ 3 de	- Ptosis - Malformaciones en el conducto lacrimal o blefaritis - Miopía $\geq -6,00$ D - Malformaciones oculares mayores o pigmentación peripapilar - Sordera o pérdida de audición - Epilepsia - Cutis marmorata - Hirsutismo generalizado - Mamas y/u ombligo pequeños - Mal rotación/malformación intestinal		
Otros sistemas	≥ 3 de	- Hernia diafragmática - Reflujo gastroesofágico - Fisura palatina - Defectos cardíacos congénitos - Micropene - Hipospadias - Criptorquidismo - Malformaciones en el tracto renal o urinario		

Tabla 18: Tabla de criterios diagnósticos de SCdL de Kline